

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 5 月 13 日 (13.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/039149 A1

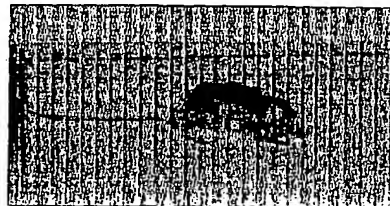
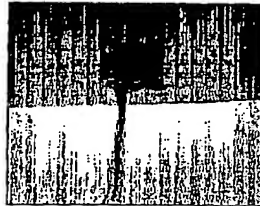
- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A01K 67/027, C12N 5/16, 15/09  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013958  
(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 29 日 (29.10.2003)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ:  
特願 2002-315091  
2002 年 10 月 29 日 (29.10.2002) JP  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立  
行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND  
TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉  
県 川口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).  
(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高井 俊行  
(TAKAI, Toshiyuki) [JP/JP]; 〒981-0952 宮城県 仙台市  
青葉区 中山 4-1 8-1 5 0 6 Miyagi (JP). 中村 晃  
(NAKAMURA, Akira) [JP/JP]; 〒989-3204 宮城県 仙  
台市青葉区 南吉成 1-3-1 0 Miyagi (JP). 菅原 章子  
(SUGAWARA, Syoko) [JP/JP]; 〒980-0013 宮城県 仙  
台市青葉区 花京院 2-2-1 6-2 0 1 Miyagi (JP). 矢  
島 佳央里 (YAJIMA, Kaori) [JP/JP]; 〒980-0813 宮城  
県 仙台市青葉区 米ヶ袋 1-3-3 7 Miyagi (JP).  
(74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052  
東京都 港区 赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 Tokyo  
(JP).  
(81) 指定国 (国内): US.

/続葉有/

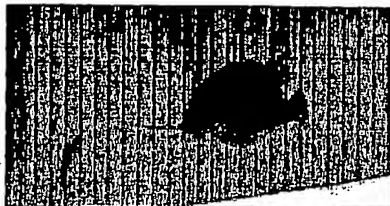
(54) Title: NONHUMAN MODEL ANIMAL SUFFERING FROM GUILLAIN-BARRE SYNDROME AND/OR FISHER SYN-  
DROME

(54) 発明の名称: ギラン・バレー症候群及び/又はフィッシャー症候群発症モデル非ヒト動物

RIIB-/-



WT



(57) Abstract: It is intended to provide a nonhuman model animal suffering from Guillain-Barre syndrome which can be obtained by immunizing an Fc  $\gamma$  RIIB knockout nonhuman animal with ganglioside GQ1b, and a method of screening a remedy for Guillain-Barre syndrome by using this nonhuman model animal. A nonhuman model mouse suffering from Guillain-Barre syndrome is constructed by immunizing an Fc  $\gamma$  RIIB knockout mouse with gangliosides GM1, GM2, GD1a and GQ1b together with Freund's adjuvant 4 times in total at intervals of 3 weeks.

(57) 要約: Fc  $\gamma$  RIIB 遺伝子欠損非ヒト動物にガングリオシド GQ1b を免疫することにより得ることのできるギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物や、該モデル非ヒト動物を用いたギラン・バレー症候群治療薬のスクリーニング方法を提供するものである。Fc  $\gamma$  RIIB 遺伝子欠損マウスを用い、ガングリオシド GM1、GM2、GD1a 及び GQ1b を 3 週間毎に計 4 回フロイント・アジュバントとともに免疫し、ギラン・バレー症候群発症

/続葉有/

WO 2004/039149 A1

WO 2004/039149 A1

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR). 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

モデルマウスを作製する。

## 明 細 書

ギラン・バレー症候群及び／又はフィッシャー症候群発症モデル非ヒト動物

5

## 技術分野

本発明は、ギラン・バレー症候群（フィッシャー症候群）を呈するモデル非ヒト動物に関する。特に、Fc $\gamma$ R IIB遺伝子の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物（Fc $\gamma$ R IIB遺伝子欠損非ヒト動物）にガン

10 リオシドGQ1bを免疫することにより得ることのできるギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物、及び、該モデル非ヒト動物を用いた、ギラン・バレー症候群治療薬のスクリーニング方法に関する。

## 背景技術

15 ギラン・バレー症候群（Guillain-Barre syndrome；GBS）は、感冒様症状を呈した後、1～2週間後に発症し、急速に進行する弛緩性の運動麻痺（四肢の筋力低下）、深部腱反射消失、嚥下障害、構音傷害、深部感覚障害、自律神経症状（不整脈、血圧の変動）を特徴とする、末梢神経における炎症性脱髄疾患である。ギラン・バレー症候群は年間人口1

20 0万人に対し2人の割合で発症し、日本全国で毎年約2000人～2500人が新たに罹患しているといわれている。しかし、これを完治し得る治療薬は未だ開発されていないばかりか、発症原因やメカニズムも明確には明らかにされておらず、いわゆる難病の類に分類され、特定疾患に指定されている。近年になって、本症候群に対する治療法として、血

25 漿交換療法（プラズマフェレーシス）や抗ガンマグロブリン大量静注法が有効であることが報告され、また、本症候群の病因として、患者血清

中に末梢神経に発現しているガングリオシドに対する自己抗体（抗糖鎖抗体）が検出され、病勢と関連することから、その発症機序にはガングリオシドと自己免疫反応が密接に関与していることが指摘されている。ガングリオシドはその分子構造からGM1、GM2、GD1a、GD1b、GT1a、GQ1b等に分けられ、該疾患において、患者血清中にはそれぞれに対する自己抗体が検出されている。特に、該ギラン・バレー症候群においては、血清中に抗ガングリオシド抗体として抗GM1抗体及び抗GD1a抗体が出現することが知られている。また、抗GQ1b抗体は、眼筋麻痺を伴うギラン・バレー症候群の急性期血清中や、フィッシャー症候群においてほぼ全例に特異的に上昇が認められている。

最近、ギラン・バレー症候群の原因として食中毒の原因菌の一つであるカンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）との関連が指摘されている。これは、カンピロバクターの糖鎖構造とガングリオシドとの間に分子相同性があり、これが自己反応性のT細胞やB細胞の出現につながると考えられている。しかし、現在まで自己抗体を含め、自己反応性T細胞やB細胞が実際の生体の病態につながるかどうかは証明されていない。動物実験レベルでは、ウサギにGD1bを免疫し、末梢神経障害を誘導した報告があるが、これまでマウスに各種ガングリオシドを免疫しても病態を発症することはなく、適切なギラン・バレー症候群の疾患モデルマウスは存在していなかった。また、上記のようにウサギに該疾患を誘導したものや、ラットに誘導したものは発症率が低く、また症状も軽いため、モデルとして不適切であった。更に、適切なモデル動物が存在しないため、治療薬や治療方法は開発されなかった。

同様に、ギラン・バレー症候群の亜型として、フィッシャー症候群（Fisher syndrome）が知られている。該フィッシャー症候群はギラン・バレー症候群の約5%が該当するといわれており、上気道感染などを先

行感染として発症するもので、外眼筋麻痺、複視、運動失調、腱反射消失、顔面神経麻痺を生ずる。上記ギラン・バレー症候群と同様の症状を呈するが、ヒトにおいて四肢の麻痺は生じない。また、フィッシャー症候群については、ガングリオシド G Q 1 b に対する血中 I g G 抗体価の上昇が報告されているが、上記ギラン・バレー症候群と同様、その発症機序は解明されておらず、また、治療薬も開発されていない。

これらの病勢は罹病後 1 ヶ月位をピークに、数ヶ月から 1 年程で徐々に回復し、予後は比較的良好であるが、後遺症を残すことも少なくない。また、1 年近くもの間、患者は精神的苦痛と入院・通院を余儀なくされるため、かかる疾患の治療薬、治療方法の開発は患者とその家族、医師達をはじめとする医療界から熱望されている。

他方、免疫系などの細胞の表面上には、I g の F c 部分を認識して結合するレセプター（以下「F c R」という）が存在し、その中でも体液中の I g G の  $\gamma$  鎖に特異的に結合する受容体蛋白質である F c  $\gamma$  レセプター（以下「F c  $\gamma$  R」という）は遺伝子構造の類似性に基づいてタイプ I（CD 6 4 抗原）、タイプ II（CD 3 2 抗原）、タイプ III（CD 1 6 抗原）の 3 種に大きく分類されている。これらのうち、F c  $\gamma$  R II は、他の F c R とは異なりモノマーの I g G に対して低親和性であり、免疫複合体となった多価 I g G と結合し、単球、マクロファージ、多形核白血球（PMN）、マスト細胞、血小板、いくつかの T 細胞リンパ球及びいくつかの B 細胞リンパ球を含む造血幹細胞に広く発現する。また、F c  $\gamma$  R II には遺伝子配列が異なる F c  $\gamma$  R IIA、F c  $\gamma$  R IIB 及び F c  $\gamma$  R IIC の 3 種類の受容体が存在しており、いずれの染色体も 1 q 2 . 3 に位置していることが知られている。

上記 F c  $\gamma$  R IIB は、他の F c R とは異なり、 $\gamma$  鎖と会合することなく、細胞内領域に抑制性シグナルを伝達するアミノ酸配列（ITIM：

Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) を有している  
(Immunol. Rev. 125, 49-76, 1992、Science 256, 1808-1812, 1992)。

このようなFc $\gamma$ RIIBの生理的機能を解明するために、本発明者らは  
Fc $\gamma$ RIIB欠損マウスを既に作出し (Nature 379, 346-349, 1996)、

- 5 Fc $\gamma$ RIIB欠損マウスをタイプIIコラーゲンで免疫することによる関節炎モデルマウス (J. Exp. Med. 189, 187-194, 1999) や、自己免疫疾患モデル動物を作製した (特開平08-289699号公報)。

これまで炎症性脱髄疾患であるギラン・バレー症候群の発症メカニズムを検討する際に適切なモデル動物がいなかった。本発明の課題は、ギ

- 10 ラン・バレー症候群 (フィッシャー症候群) を呈するモデル非ヒト動物を提供することにある。より詳しくは、Fc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損非ヒト動物にガングリオシドGQ1bを免疫することにより得ることのできるギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物や、該モデル非ヒト動物を用いたギラン・バレー症候群治療薬のスクリーニング方法を提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究の結果、Fc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損マウスを用い、ガングリオシドGM1、GM2、GD1a及びGQ1bを3週間毎に計4回フロイント・アジュバントとともに免疫し、ギラン・バレー症候群モデルマウスの作製を試みた。その結果、こ

- 20 れらガングリオシド抗原を免疫したもののうち、GQ1bを免疫したFc $\gamma$ RIIB遺伝子欠損マウスにおいて尾及び後肢が麻痺する末梢神経障害を認めた。このマウスではGQ1bに対する抗体価が上昇することから、通常、ヒトで認められるGQ1bに対する自己抗体が認められるギラン・バレー症候群の亜型であるフィッシャー症候群 (Fisher syndrome) に矛盾しない症状と考えられ、ギラン・バレー症候群 (フィ  
25 ッシャー症候群) の新規疾患モデルマウスが得られることを見出し、

本発明を完成するに至った。また、本発明に基づき、該症候群に対する有効な治療薬のスクリーニング方法を構築した。

#### 発明の開示

- 5      すなわち本発明は、FcγRIIB遺伝子の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をガングリオシドGQ1bで免疫することにより得られ、ギラン・バレー症候群を呈することを特徴とするギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物（請求項1）や、ギラン・バレー症候群がフィッシャー症候群であることを特徴とするギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物（請求項2）や、尾及び後肢が麻痺する末梢神経傷害であることを特徴とする請求項1又は2記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物（請求項3）や、FcγRIIB遺伝子欠損非ヒト動物が、げっ歯類動物であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物（請求項4）や、げっ歯類動物が、マウスであることを特徴とする請求項5記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物（請求項5）に関する。

- 20      また本発明は、請求項1～5のいずれか記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物に、被検物質を投与し、該発症モデル非ヒト動物におけるギラン・バレー症候群の症状の程度を観察・評価することを特徴とするギラン・バレー症候群の治療薬のスクリーニング方法（請求項6）や、請求項1～5のいずれか記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物に、被検物質を投与し、抗GQ1b抗体の出現の程度を測定・評価することを特徴とするギラン・バレー症候群及び／又はフィッシャー症候群治療薬のスクリーニング方法（請求項7）や、請求項6又は7記載のギラン・バレー症候群治療薬のスクリーニング方法によって得られる治療薬（請求項8）に関する。

### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のギラン・バレー症候群及び／又はフィッシャー症候群発症モデル非ヒト動物の尾及び後肢が麻痺している様子（上図；R I I B<sup>-/-</sup>）及びコントロールとしての野生型マウス（下図；W T）を表す写真である。

第2図は、本発明のギラン・バレー症候群及び／又はフィッシャー症候群発症モデル非ヒト動物及びコントロールとしての野生型マウスの麻痺症状スコアを示す図である。

10 第3図は、本発明のギラン・バレー症候群及び／又はフィッシャー症候群発症モデル非ヒト動物及びコントロールとしての野生型マウスの血清抗G Q 1 b抗体I g G 1、I g G 2 a及びI g G 2 bの抗体価を示す図である。

### 15 発明を実施するための最良の形態

本発明のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物としては、F c γ R I I B 遺伝子の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をガングリオシドG Q 1 bで免疫することにより得られ、ギラン・バレー症候群を呈する非ヒト動物であれば特に制限されるものではない。ここでギラン・バレー症候群とは、非遺伝性の疾患であって、感冒様症状を呈した後、1  
20 ～2週間後に引き起こされ、急速に進行する弛緩性の運動麻痺（四肢の筋力低下）、深部腱反射消失、嚥下障害、構音傷害、深部感覚障害、自律神経症状（不整脈、血圧の変動）を特徴とする疾患やそれらに類似した疾患である。かかるギラン・バレー症候群を発症した場合、ガングリオシドG Q 1 bに対する血清中の抗体価が上昇し、より具体的には、外眼筋麻痺、複視、運動失調、腱反射消失、顔面神経麻痺、尾や後肢等の末  
25



梢神経障害等を生じる。また、上記ギラン・バレー症候群と同様の症状を呈するが、ヒトにおいて四肢の麻痺を生じないフィッシャー症候群もギラン・バレー症候群の一つである。

本発明のFc $\gamma$ R IIB遺伝子欠損非ヒト動物としては、Fc $\gamma$ R IIB  
5 遺伝子機能が染色体上で欠損したモデル動物であればどのようなものでもよいが、マウスやラット等のげっ歯類、特に、該Fc $\gamma$ R IIB遺伝子の機能が染色体上で欠損したマウスを好適に挙げることができ、該Fc $\gamma$ R IIB遺伝子の機能が染色体上で欠損したマウスは、本発明者らの前掲の文献（Nature 379, 346-349, 1996）に記載する方法等によって作製  
10 することができる。具体的には、マウス遺伝子ライブラリーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用い、Fc $\gamma$ R IIB遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされたFc $\gamma$ R IIB遺伝子を、ウイルスベクター等を用いてサブクローンし、DNAシーケンシングすることにより特定する。このクローンのS<sub>2</sub>エキソン及びEC<sub>1</sub>エキソンを含むフ  
15 ラグメントをpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換することによって、ターゲットベクターを調製する。この線状化されたベクターをエレクトロポレーション（電気穿孔）法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418等に抵抗性を示すES細胞を選択し、その細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロ  
20 インジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、Fc $\gamma$ R IIBノックアウトマウスを得ることができる。

25 本発明におけるギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物の作製方法としては、ギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物を得ることの

できる方法であればどのような方法でも良く、特に限定されるものではないが、前記のFcγRIIB遺伝子欠損非ヒト動物に、抗原としてガングリオシドGQ1bを免疫する方法を好適に例示することができる。また、免疫する方法としては、特に限定されるものではないが、初回免疫  
5 時にGQ1b抗原をコンプリート・フロイント・アジュバントとともに免疫し、以後3週間毎にインコンプリート・フロイント・アジュバントとともに免疫する方法を好適に例示することができる。また、合計3～6回免疫するのが望ましいが、特に合計4回免疫するのが好ましい。

本発明において用いられるガングリオシドGQ1bは、ラクトシルセラミド(Cer)からb経路合成系で産生されるスフィンゴ糖脂質であ  
10 って、シアル酸(Sia)を4つ有し、Galβ1→3(3←2αSia3←2αSia)GalNAcβ1→4Galβ1→4(3←2αSia3←2αSia)Glcβ1→1' Cerの構造を有するスフィンゴ糖脂質をいう。これらのうち、該GQ1bの特性は、特有の糖鎖である3←2αSiaの結合形式によって特徴づけられている。また、各ガ  
15 ングリオシドには特異的な抗体が得られている。各ガングリオシドを認識する抗体は、上記の糖鎖3←2αSiaの結合形式の相違を認識していることから、該抗GQ1b(モノクローナル)抗体も、4つの3←2αSiaの結合形式を特異的に認識していると考えられる。

20 本発明のギラン・バレー症候群治療薬のスクリーニング方法としては、本発明のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物を用い、該治療薬の薬理的効果を確認し、選別することのできるスクリーニング方法であれば特に限定されるものではないが、例えば、本発明のギラン・バレー  
症候群発症モデル非ヒト動物に被検物質を経口的又は非経口的に投与し、  
25 病状をスコア化して経時的に症状の程度(軽減の度合い)を観察・評価する方法や、本発明のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物に

被検物質を投与し、該モデル非ヒト動物の血中に出現している抗GQ1b抗体の出現程度を測定・評価する方法を具体的に挙げることができる。上記血中に出現している抗GQ1b抗体の出現程度を測定する方法としては、2次抗体を用いたELISA分析を具体的に例示することができる。

本発明の上記スクリーニング方法により得られるギラン・バレー症候群治療薬は、ギラン・バレー症候群（フィッシャー症候群）を発症した患者の治療に用いることができる。本発明のギラン・バレー症候群治療薬は、経口的あるいは非経口的に投与することができる。経口投与剤としては散剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤などの固形製剤あるいはシロップ剤、エリキシル剤などの液状製剤とすることができる。また、非経口投与剤として注射剤、経皮製剤あるいは座薬等とすることができる。これらの製剤は活性成分に薬理学的、製剤学的に認容される助剤を加えることにより常法に従って製造することができる。また、投与量は、対象疾患の種類、患者の年齢、性別、体重、症状、投与形態に応じて適宜決定することができる。

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

#### 参考例（FcγRIIB欠損マウスの作製）

129/Sv/J（H-2b）マウスのゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによって、FcγRIIB遺伝子のゲノムDNAのクローンを単離した。ターゲットベクターは、このクローンのS<sub>2</sub>及びEC<sub>1</sub>の2つの独立したエキソンを含む2.65KbのフラグメントをpMC1ネオ遺伝子カセット（東洋紡社製）に、置換することによ

て作製した。この線状化したベクターをエレクトロポレーションによってES細胞(J1)に導入し、相同的組換えを行った。

上記の相同的組換えを起こしたES細胞からESクローンを単離し、G418及びGANC(ガンシクロピア)に対してネオマイシン耐性ESクローンをスクリーニングし、サザンブロット法によって相同的組換え体を同定した。その同定された相同的組換え体からゲノムDNAを単離して、HindIIIでダイジェストし、pMC1ネオ遺伝子カセットを含むターゲティングされた対立遺伝子を含んでいることを確認した。かかる確認されたESクローンを胚盤胞中にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製し、作製されたマウスを野生型のC57BL/6(H-2b)マウスとインタークロスさせることによってヘテロ接合体マウスを得て、また、ホモ接合体マウスを得るために、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせて、FcγRIIB遺伝子の機能が染色体上で欠損したマウス及びその野生型マウスを作製した。

15

#### 実施例1 (FcγRIIB遺伝子欠損マウスへの免疫)

ガングリオシドとして、GM1、GM2、GD1a、GD1b及びGQ1b(いずれもALEXIS社製)を用いた。各ガングリオシド1mg/mlを含むガングリオシド溶液1mlと、流動パラフィン、界面活性剤及び結核死菌からなる完全フロイントアジュバンド(CFA)3mg/mlとを連結シリンジ中で混合し、また各ガングリオシド1mg/mlを含むガングリオシド溶液1mlと、流動パラフィンと界面活性剤とからなる不完全フロイント・アジュバンド(IFA)3mg/mlとを連結シリンジ中で混合して、2種類のエマルジョンを作製した。

上記参考例記載の方法により作製したFcγRIIB遺伝子欠損マウス(8週齢：雌雄差なし)(n=5)をエーテルで麻酔し尾背部を剃毛し、

各ガングリオシドとCFAとをそれぞれ50 $\mu$ gと100 $\mu$ gとを含むエマルジョン150 $\mu$ lをマウスの皮内に注射して一次免疫を行い、その一次免疫後、3週間毎に3回、各ガングリオシドとIFAとをそれぞれ50 $\mu$ gと100 $\mu$ gとを含むエマルジョン150 $\mu$ lを皮内に注射し、ギラン・バレー症候群発症マウスの作製を試みた。また、対照として野生型マウス(n=5)を用いた。その結果、GQ1bを免疫したFc $\gamma$ RIIIB遺伝子欠損マウスにおいて、後肢と尾部に麻痺が生じる末梢神経障害を認めた。このマウスは後肢が開き、歩行することができず、また尾は垂れ下がっていた(第1図; RIIIB<sup>-/-</sup>)。一方、GM1、GM2、GD1a、GD1bを免疫したFc $\gamma$ RIIIB遺伝子欠損マウスやコントロールである野生型マウス(第1図; WT)においては、麻痺症状などが認められなかった。

#### 実施例2 (麻痺症状スコアー)

15 GQ1b免疫を行った野生型マウス及びFc $\gamma$ RIIIB遺伝子欠損マウスについて、その症状によって点数化し、0点:無症状、1点:尾の麻痺、2点:尾及び両側後肢の麻痺、3点:尾及び四肢麻痺、4点:死亡の5段階に分けて評価した。結果を第2図に示す。なお、第2図中、野生型マウスの点数は黒の四角(■)で表し、Fc $\gamma$ RIIIB遺伝子欠損マウスの点数は白の四角(□)で表した。その結果、Fc $\gamma$ RIIIB遺伝子欠損マウスにGQ1b免疫を行ったマウスは、ギラン・バレー症候群(フイッシャー症候群)の発症を認めた(第2図)。

#### 実施例3 (GQ1bに対する血清抗体価)

25 また、一次免疫後、3週、6週、9週及び12週後に採血を行い、GQ1b免疫を行った野生型マウス及びFc $\gamma$ RIIIB遺伝子欠損マウスの

眼窩より採血を行ない、文献 (Cell. Immunol. 145, 299-310, 1992) 記載の E L I S A 分析に改良を加えた次の方法により、G Q 1 b に対する抗体価を検査した。50 mM 炭酸水素ナトリウム溶液 (pH = 8.5) 1 ml に 5  $\mu$ g の G Q 1 b を溶解させ、この溶解液を 1 ウェル当たり 50  $\mu$ l の割合で用い、正に帯電した 96 ウェルマイクロプレート (N U N C 社製) を 4℃ にて一晩コーティングした後、0.05% の T w e e n 20 と 0.1% の B S A を含む P B S で 1 回洗浄し、1 ウェル当たり 250  $\mu$ l の 0.5% の B S A を含む P B S で 4℃ にて一晩ブロックした。次に上記血液から得られた血清を 500 に希釈し、その希釈した血清を 1 ウェル当たり 50  $\mu$ l の割合で上記 96 ウェルマイクロプレートに加え、4℃ にて一晩反応させた。反応後、96 ウェルマイクロプレートを 0.05% の T w e e n 20 を含む P B S で 3 回洗浄し、ペルオキシダーゼ (シグマ社製) が結合したヤギ抗マウス I g G 1、I g G 2 a 又は I g G 2 b を 500 倍に希釈したものを 50  $\mu$ l 加えて、4℃ にて 2 時間インキュベートした。インキュベート後、再び 0.05% の T w e e n 20 を含む P B S で 3 回洗浄し、50  $\mu$ l の TureBlue Peroxidase Substrate (Kirkegaard & Perry Labs 社製) と共に 30 分間室温で酵素反応を行った。その後、マイクロプレートリーダー (Biolumin 960; Molecular Dynamics 社製) で O D 450 を測定した。結果を第 3 図に示す。なお、第 3 図中、野生型マウスの吸光度は黒の四角 (■) で表し、F c  $\gamma$  R I I B 遺伝子欠損マウスの吸光度は白の四角 (□) で表した。これらの結果から、F c  $\gamma$  R I I B ノックアウトマウス (I I B - K O) は、野生型マウス (W i l d) に比べて、G Q 1 b に対する抗体価 (I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b) の上昇が認められ、ギラン・バレー症候群 (フィッシャー症候群) の所見と矛盾していないことから、ギラン・バレー症候群 (フィッシャー症候群) 発症モデルマウスが作製でき

たことがわかった。

#### 産業上の利用可能性

- 本発明のギラン・バレー症候群及び／又はフィッシャー症候群発症モデル非ヒト動物は、尾及び後肢に麻痺症状を呈し、ガングリオシドに対する抗体価が高いことから、ヒトにおけるギラン・バレー症候群及び該症候群の亜型であるフィッシャー症候群に合致する症状を発症しているとみなすことができ、これら症状の治療方法や治療薬の開発に用いることができる。
- 5

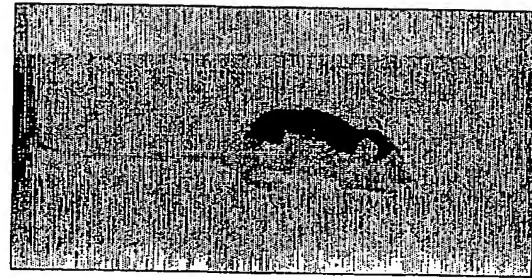
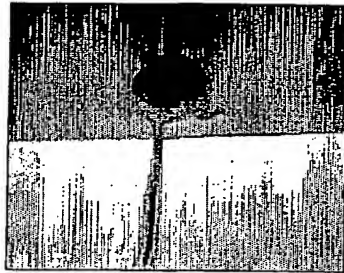
## 請 求 の 範 囲

1. FcγRIIB遺伝子の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物をガン  
グリオシドGQ1bで免疫することにより得られ、ギラン・バレー症候  
5 群を呈することを特徴とするギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動  
物。
2. ギラン・バレー症候群がフィッシャー症候群であることを特徴とす  
るギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物。
3. 尾及び後肢が麻痺する末梢神経傷害であることを特徴とする請求項  
10 1又は2記載のギラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物。
4. FcγRIIB遺伝子欠損非ヒト動物が、げっ歯類動物であることを  
特徴とする請求項1～3のいずれか記載のギラン・バレー症候群発症モ  
デル非ヒト動物。
5. げっ歯類動物が、マウスであることを特徴とする請求項5記載のギ  
15 ラン・バレー症候群発症モデル非ヒト動物。
6. 請求項1～5のいずれか記載のギラン・バレー症候群発症モデル非  
ヒト動物に、被検物質を投与し、該発症モデル非ヒト動物におけるギラ  
ン・バレー症候群の症状の程度を観察・評価することを特徴とするギラ  
ン・バレー症候群の治療薬のスクリーニング方法。
- 20 7. 請求項1～5のいずれか記載のギラン・バレー症候群発症モデル非  
ヒト動物に、被検物質を投与し、抗GQ1b抗体の出現の程度を測定・  
評価することを特徴とするギラン・バレー症候群及び／又はフィッシャ  
ー症候群治療薬のスクリーニング方法。
8. 請求項6又は7記載のギラン・バレー症候群治療薬のスクリーニン  
25 グ方法によって得られる治療薬。

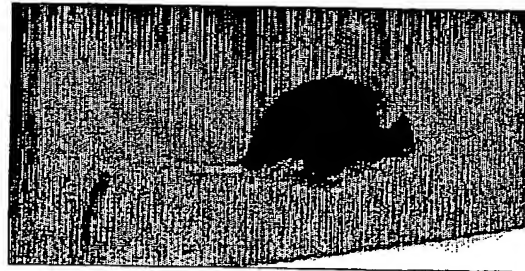


第 1 図

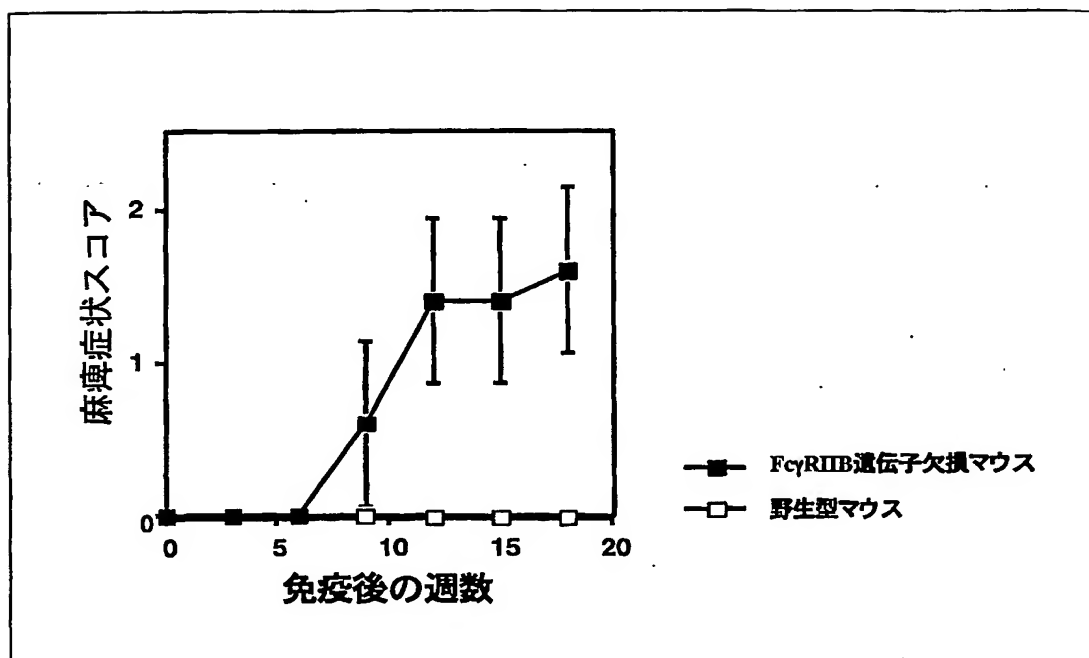
RIIB-/-



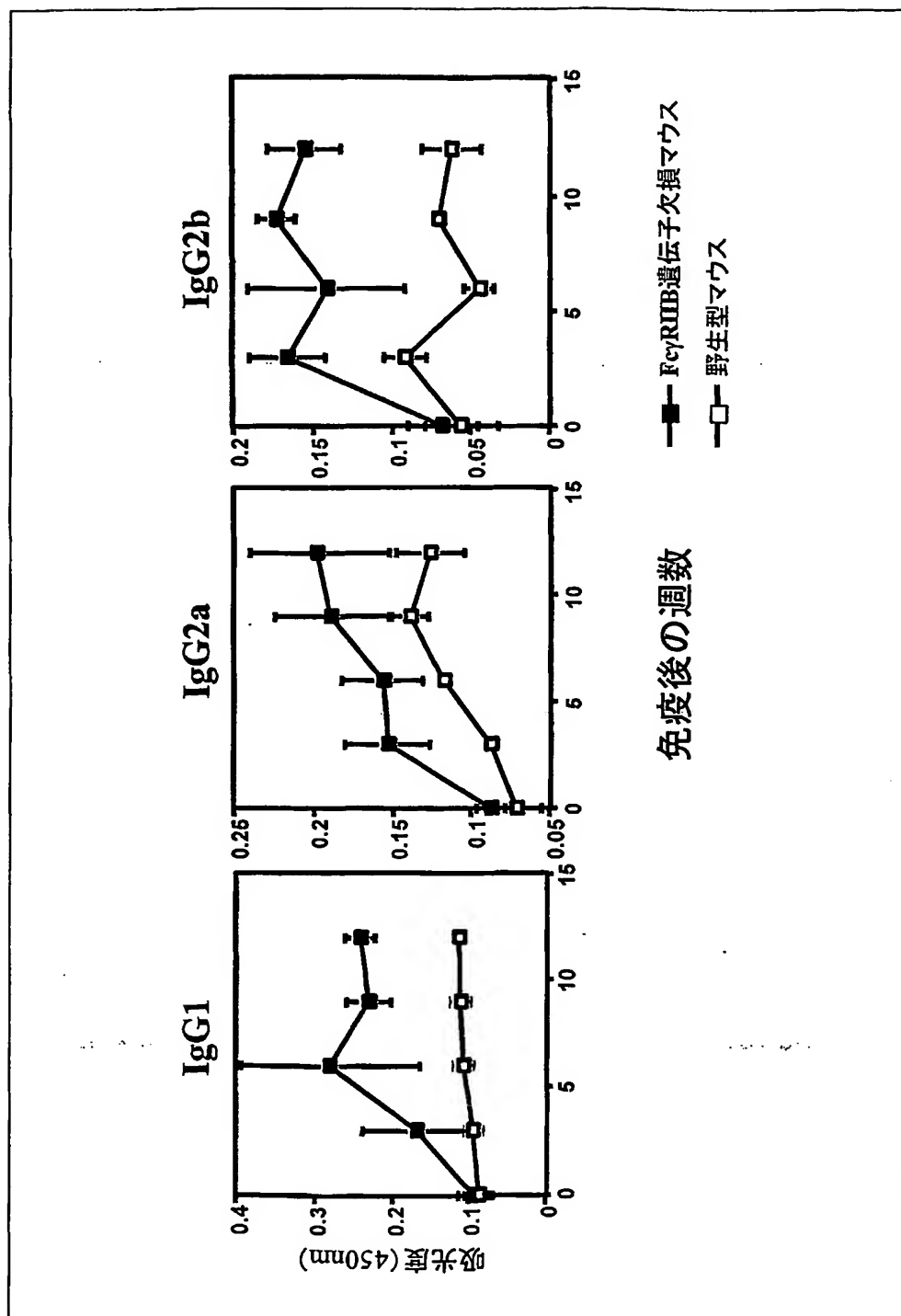
WT



## 第 2 図



## 第 3 図



国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/13958

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> A01K67/027, C12N5/16, C12N15/09		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>7</sup> A01K67/027, C12N5/16, C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Yuasa T, et. al., Deletion of fcgamma receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis., J Exp Med. (1999), Vol. 189, No. 1, p. 187-94.	1-7
Y	Takai T, et. al., Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice., Nature. (1996), Vol. 379, No. 6563, p. 346-349	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	25. 11. 03	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 美葉子 印
		4N 9839 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

C (続き) : 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Odaka M, et. al., N-glycolylneuraminic acid-containing GM1 is a new molecule for serum antibody in Guillain-Barre syndrome., Ann Neurol. (1998), Vol. 43, No. 6, p. 829-834	1 - 7
Y	薄敬一郎, et. al., 軸索型ギラン・バレー症候群モデル動物の樹立: 第2報, 免疫性神経疾患に関する調査研究班 平成12年度研究報告書(2001), p. 111-112	1 - 7

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 8 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲8に記載の「スクリーニング方法により得られる治療薬」については、化合物として具体的にどの化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのが全く不明であって、請求の範囲の記載は著しく不明確である。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(1)) (1998年7月)